

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21190

研究課題名(和文)薬剤に対してプライムされた骨髄細胞に焦点を当てた薬剤性肺障害の病態解明

研究課題名(英文)Clarification of pathophysiology of drug-induced lung injury focusing on drug-primed bone marrow cells

研究代表者

中島 拓(Nakashima, Taku)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：90643792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は骨髄細胞が投与薬剤に対して準備状態を成立させるとの仮説を立て、そのメカニズムを解明することで、薬剤性肺障害の病態を解明することを目的とした。ブレオマイシン(BLM)を投与されたマウス骨髄を移植するとドナーマウスにはコントロール群と比較して強いBLM肺障害が誘導され、肺胞洗浄液中のB7H3陽性細胞が増加していた。同一個体において、BLMを少量投与すると、2回目のBLM投与により強い肺障害が誘導されたが、2回目のBLM投与前に骨髄移植を行うことでその増強効果は消失した。この結果から薬剤性肺障害にB7H3分子が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of drug-induced lung injury (DILD), we hypothesize that the lung response to an initial insult, such as bleomycin (BLM) treatment, alters the phenotype of bone marrow (BM) cells such that they will contribute to exacerbation of DILD. Cells from BM of control or BLM-treated donor mice were transplanted into naive recipient mice. Upon BLM treatment recipient mice transplanted with BM from BLM-pretreated donors showed significant exacerbation of fibrosis relative to mice receiving BM from controls. Moreover B7H3 positive cell numbers were solely upregulated among analyzed B7 family molecules. These effects were also noted in BLM-treated mice that were pretreated with a suboptimal dose of BLM, but were abolished if the mice were transplanted with BM from naive mice. These results suggested that B7H3 played a role in the pathophysiology of DILD.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺障害 骨髄移植 B7Hファミリー

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤性肺障害は「医薬品が適切に使用されたにも関わらず、有害な反応が呼吸器系に生じたもの」と定義される。ほとんど全ての薬剤が薬剤性肺障害の原因となり、生命を脅かすことすら珍しくないが、薬剤性肺障害の発症機序は大部分が未解明であり、確立された診断法もないことが日常臨床において重大な問題となっている。抗がん剤であるプレオマイシンは、ヒト薬剤性肺障害を起こす代表的な薬剤である。プレオマイシンの総投与量と肺障害の関連性が指摘されており、その薬剤性肺障害の原因としてプレオマイシンが直接肺の細胞を障害することが重視されてきた。マウスプレオマイシン肺障害モデルにおいても、通常1回のプレオマイシン気管内投与により肺障害が誘導されるが、これは時間と共に改善する。ここでプレオマイシンをさらに繰り返し投与すると肺障害が悪化することが知られており、この悪化の原因は前述のように単にプレオマイシン総投与量の問題とみなされてきたが、そのメカニズムは詳細には検討されていない。

### 2. 研究の目的

研究代表者は過去の検討で「プレオマイシン肺障害時にマクロファージなど単球由来の細胞が骨髄から肺へと動員され肺障害を増強させること」を明らかにした。この知見を基に研究代表者は、プレオマイシンの繰り返し投与による肺障害悪化のメカニズムとしてプレオマイシン投与により骨髄単球系細胞が薬剤に対して準備状態を成立させる(これを骨髄が薬剤プレオマイシンに対して「プライムされた」と表現する)との仮説を立てた。本研究では薬剤により骨髄がプライムされるメカニズムを解明することで、薬剤性肺障害の病態を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究に関わる実験は承認された実験計画書に基づき「広島大学動物実験等規則」に従い、広島大学附属動物実験施設において実施した。一部の実験は当該施設の動物実験規則に従い、ミシガン大学において実施した。動物実験には7~10週齢雌のC57BL/6マウス野生型およびB7H3 knock out マウスを用い、「プレオマイシン肺線維症モデル」は、経気道的にPBSに溶解したプレオマイシン2.5mg/kgを投与して作成した。コントロール群にはPBSのみを投与した。「マウス骨髄移植モデル」の作成には540cGyの放射線照射を3時間間隔で2度照射し、2度目の放射線照射後速やかに骨髄細胞を尾静脈より静脈注射により移植することで作成した。これらの動物モデルを用い、以下の方法で実験を行った。

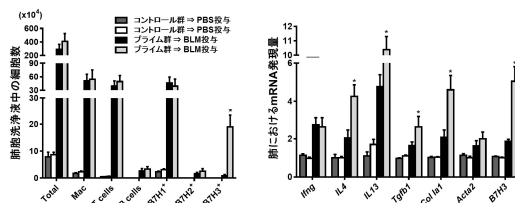
- 1) プレオマイシンに対しプライムされた骨髄単球系細胞のマーカーとなり得る分子を探索する。
- 2) 放射線照射を介さないプレオマイシン 2

回投与の系でも B7H3 分子の発現が亢進するかどうかを明らかにする。

3) 骨髄移植を行う際の致死放射線照射の前処置により骨髄細胞を破壊することで、プレオマイシンに対してプライムされた骨髄細胞の準備状態が解除できるかどうかを明らかにする。

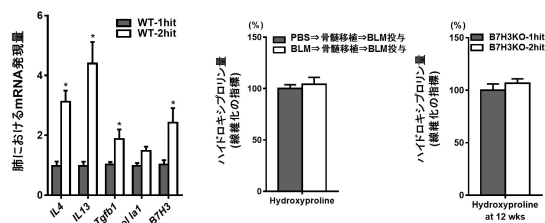
### 4. 研究成果

我々は予備実験で「プレオマイシンの投与を受けたマウス骨髄(プライム群)および「プレオマイシン未投与のマウス骨髄(コントロール群)」をドナー細胞として用いた骨髄移植モデルを作成し、双方のレシピエントマウスにさらにプレオマイシン肺障害を誘導すると、「プライム群」において「コントロール群」と比較してプレオマイシン肺障害が悪化することを確認していた。両群マウスより得られた気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞をさらに詳細に比較検討したところ「プライム群」で「コントロール群」と比較し、免疫制御に関わる分子である B7H ファミリーのうち、B7H1 および B7H2 発現には差がないが、B7H3 陽性細胞が有意に増加することを見出した。さらに「プライム群」では「コントロール群」と比較して、肺組織において線維化に関わる TGF および Th2 系サイトカインである IL-4、IL-13 と共に B7H3 の mRNA 発現が有意に亢進していることが確認された(下図)。



骨髄移植には放射線照射など肺線維症を誘導しうる過程が含まれるため、それら骨髄移植に伴う前処置自体が肺線維症に与える影響を否定できない。そこで、B7H3 タンパク自体が放射線照射を行わない同一個体において肺線維症に与える影響について、放射線照射を介さないモデルを用いて検討した。我々の開発した「2hit モデル」では初回肺線維症を誘導しない少量プレオマイシン気管内投与(コントロールとしては PBS のみ投与)を行うと、2回目の通常量プレオマイシン投与によって引き起こされる肺線維症が明らかに増強される。この系を用いて、初回にプレオマイシン少量をする投与群(2hit 群)の肺では初回 PBS のみを投与する群(1hit 群)と比較して、B7H3 mRNA 発現が亢進されることが判明した。また、初回投与後に健常マウス骨髄を移植することで 2hit 後の肺線維症増強を回避できること、さらに B7H3 knock out マウスでは 2hit 群においても 1hit 群と比較して肺線維症増強が見られないことを

明らかとした (下図)。



これら 2hit 群では 1hit 群と比較して、気管支肺胞洗浄液中の可溶性 B7H3 タンパク増加が確認された。さらにヒト薬剤性肺障害の肺胞洗浄液中でも可溶性 B7H3 タンパクが検出可能であることが明らかとなった。これらの成果について論文を作成し、現在投稿準備中である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Fukuhara K, Nakashima T, Abe M, Masuda T, Hamada H, Iwamoto H, Fujitaka K, Kohno N, Hattori N. Suplatast tosilate protects the lung against hyperoxic lung injury by scavenging hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 査読有, 2017, 106, pp.1-9, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.014.

2. Omori K, Iwamoto H, Yamane T, Nakashima T, Haruta Y, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N. Clinically remitted childhood asthma is associated with airflow obstruction in middle-aged adults. *Respirology* 査読有, 2017, 22, pp.86-92, DOI: 10.1111/resp.12860.

3. Ding L, Liu T, Wu Z, Hu B, Nakashima T, Ullenbruch M, Gonzalez De Los Santos F, Phan SH. Bone Marrow CD11c+ Cell-Derived Amphiregulin Promotes Pulmonary Fibrosis. *J Immunol* 査読有, 2016, 197, pp.303-312, DOI: 10.4049/jimmunol.1502479.

4. Hamai K, Iwamoto H, Ishikawa N, Horimasu Y, Masuda T, Miyamoto S, Nakashima T, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Hattori N, Kohno N. Comparative Study of Circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as Disease Markers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Dis Markers*. 査読有, 2016, 2016, p.4759040, DOI: 10.1155/2016/4759040.

5. Omori K, Hattori N, Senoo T,

Takayama Y, Masuda T, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Hamada H, Kohno N. Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Attenuates Transforming Growth Factor- $\alpha$ -Dependent Epithelial Mesenchymal Transition and Differentiation of Fibroblasts to Myofibroblasts. *PLoS One* 査読有, 2016, 11, e0148969, DOI: 10.1371/journal.pone.0148969.

6. Ihara D, Hattori N, Horimasu Y, Masuda T, Nakashima T, Senoo T, Iwamoto H, Fujitaka K, Okamoto H, Kohno N. Histological Quantification of Gene Silencing by Intratracheal Administration of Dry Powdered Small-Interfering RNA/Chitosan Complexes in the Murine Lung. *Pharm Res* 査読有, 2015, 32, pp.3877-3885, DOI: 10.1007/s11095-015-1747-6.

7. Akita S, Hattori N, Masuda T, Horimasu Y, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Miyake M, Kohno N. MT95-4, a fully humanized antibody raised against aminopeptidase N, reduces tumor progression in a mouse model. *Cancer Sci* 査読有, 2015, 106, pp.921-928, DOI: 10.1111/cas.12692.

[学会発表](計10件)

1. Takahiko Otsuki, Noboru Hattori, Hironobu Hamada, Yusuke Takayama, Yasushi Horimasu, Takeshi Masuda, Shintarou Miyamoto, Taku Nakashima, Hiroshi Iwamoto, Kazunori Fujitaka, Nobuoki Kohno. Anti-Tumor Effect of MT95-4, a Fully Humanized Anti-Aminopeptidase N Monoclonal Antibody, on Tumor Progression in an Animal Model of Malignant Pleural Mesothelioma, American Thoracic Society, 2016(国際学会), 2016年5月13日~18日, San Francisco, CA, U.S.A

2. Takeshi Masuda, Noboru Hattori, Yasushi Horimasu, Shintarou Miyamoto, Taku Nakashima, Hiroshi Iwamoto, Kazunori Fujitaka, Nobuoki Kohno. PAI-1 Plays an Important Role in Lung Cancer Progression Through Differentiation of Cancer-Associated Fibroblasts to Myofibroblasts, American Thoracic Society, 2016(国際学会), 2016年5月13日~18日, San Francisco, CA, U.S.A

3. Sachiko Shioya, Noboru Hattori, Takeshi Masuda, Tadashi Senoo, Yasushi Horimasu, Taku Nakashima, Hiroshi Iwamoto, Kazunori Fujitaka, Nobuoki Kohno. PAI-1 Plays an

Important Role in Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis, American Thoracic Society, 2016 (国際学会), 2016年5月13日~18日, San Francisco, CA, U.S.A

4. 大月 鷹彦、服部 登、高山 裕介、堀益 靖、益田 武、中島 拓、宮本真太郎、岩本 博志、藤高 一慶、濱田 泰伸、河野 修興. ヒト型抗 APN 抗体の抗腫瘍効果—悪性中皮腫マウスモデルにおける検討, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016年4月8日~10日, 京都

5. 益田 武、堀益 靖、宮本 真太郎、中島 拓、岩本 博志、藤高 一慶、服部 登、河野 修興. 癌関連線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化による腫瘍進展促進: PAI-1 の関与の検討, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016年4月8日~10日, 京都

6. Kakuhiro Yamaguchi, Hiroshi Iwamoto, Yasushi Horimasu, Takeshi Masuda, Taku Nakashima, Shintaro Miyamoto, Kazunori Fujitaka, Noboru Hattori, Witold Mazur, Nobuoki Kohno. Decreased circulatory receptor for advanced glycation end-products is associated with poorer survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016年4月8日~10日, 京都

7. Keitaro Omori, Noboru Hattori, Hiroshi Iwamoto, Takashi Yamane, Taku Nakashima, Yoshinori Haruta, Akihito Yokoyama, Nobuoki Kohno. Clinically remitted childhood asthma is a risk factor for airflow obstruction in middle-aged adults, European respiratory society annual congress 2015 (国際学会), 2015年9月26日~30日, Amsterdam, Netherlands

8. 福原 和秀, 益田 武, 岩本 博志, 中島 拓, 服部 登, 河野 修興. 膠原病肺における血清・BALF 中の the receptor for advanced glycation end-product と肺機能・画像パターンの相関についての検討, 第 38 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会, 2015年6月11日~12日, 東京

9. 塩谷 咲千子、服部 登、平野 有美、妹尾 直、益田 武、堀益 靖、中島 拓、岩本 博志、村井 博、河野 修興. 放射線肺線維症マウスモデルにおける肺の線維化と PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) の関与についての検討, 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 2015年4月17日~19日, 東京

10. 益田 武、服部 登、大森 慶太郎、堀益 靖、中島 拓、岩本 博志、藤高 一慶、村井 博、

河野 修興. PAI-1 は癌関連線維芽細胞の筋線維芽細胞への変化に関わり腫瘍進展を促進する, 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 2015年4月17日~19日, 東京

〔図書〕(計1件)

1. 中島 拓, 服部 登. 特発性間質性肺炎診断と治療の手引き (改定第3版), 南江堂, 2016, 156 (26-30).

6. 研究組織

(1) 研究代表

中島 拓 (NAKASHIMA TAKU)

広島大学病院・病院(医)・病院助教

研究者番号: 90643792